

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

増 渕 裕 朗 印

(学位論文のタイトル)

Reduced transient receptor potential vanilloid 2 expression in alveolar macrophages causes COPD in mice through impaired phagocytic activity

(肺胞マクロファージにおけるTRPV2の発現低下は食食能の低下を通してマウスにCOPDを引き起こす)

(学位論文の要旨)

【背景と目的】

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は慢性進行性の末梢気道閉塞によって定義され、主に喫煙によって引き起こされる。その慢性炎症にはプロテアーゼバランスの不均衡、小胞体ストレス、酸化ストレスなどが関連していると言われている。COPDの発症には肺胞マクロファージが重要な役割を果たしており、過去の研究から、COPD患者では肺胞マクロファージが増加していること、その食食能が低下し、アポトーシスした気道上皮細胞や細菌に対する食作用が低下していることなどが、COPD形成における慢性炎症の持続の一つの理由と考えられている。肺胞マクロファージの食食能の低下には様々な原因が検討されているが、正確なメカニズムは未だ解明されていない。

温度感覚受容体であるTransient receptor potential vanilloid (TRPV) は多様な生理機能を持つ非選択制のカチオンチャネルである。複数のTRPVチャネルが様々な組織で確認されており、近年では、マクロファージの細胞膜に発現しているTRPV2はマクロファージの食食能に関わっているとされている。オプソニン化された異物がマクロファージのファゴソーム受容体によって認識され、凝集化されながらファゴソームに取り込まれる。このときに小胞体内のTRPV2が細胞膜にトランスロケーションし、ファゴソームを形成する。その際にTRPV2はカルシウム透過性陽イオンチャネルとしての機能を活性化し、陽イオンの流入と脱分極を惹起し、食食作用を亢進させるとされる。

喫煙に暴露された肺胞マクロファージにおけるTRPV2の機能は不明であるが、TRPV2の発現低下が食食能の低下を引き起こすことから、喫煙によって肺胞マクロファージのTRPV2の発現は低下するのではないかと我々は考えた。このTRPV2の発現低下がCOPD発症の要因の一つになるのではないかと仮説を立て、実験によってそれを証明した。

【方法】

In vitroにおいて、MH-S cellsに対して10%の煙草抽出液(CSE)による刺激を行い、TRPV2の発現を免疫染色、Q-PCR法およびウエスタンブロット法で確認し、またFITC-dextran phagocytosis assayを用いてCSE刺激を受けたMH-S cellsの食食能を確認した。10%CSEの刺激時間は24時間としたが、食食能の確認は6時間、12時間の刺激でも行った。また、MH-S cellsに対してsiTRPV2の導入を行い、TRPV2の発現を抑制した状態でも食食能を確認した。

In vivoにおいて、2ヵ月、および6ヵ月間喫煙させたマウスに肺胞洗浄を行って肺胞マクロファージを回収し、TRPV2の発現を免疫染色、ウエスタンブロット法で確認した。またおFITC-dextran phagocytosis assayを用いて食食能を確認した。さらに、TRPV2 KO マウスを用いて同様に肺胞マクロファージを回収し、食食能を確認した。

【結果】

in vivoにおいて、24時間の10%CSE刺激を加えられたMH-S cellsは、無刺激のMH-S cellsと比較してTRPV2の発現は優位差を持って低下していた。食食能については6時間、12時間、24時間の刺激でいずれも優位差をもって低下しており、siTRPV2の導入したMH-S cellsにおいても食食能は低下していた。

in vivoにおいて、2ヵ月喫煙マウスの肺胞マクロファージではTRPV2の発現は優位差を持って低下しており、さらに食食能も低下していた。6ヵ月喫煙マウスでは、食食能の低下は2ヵ月喫煙マウスと比較してやや軽度ではあるものの低下していたが、TRPV2の発現についてはむしろ増加傾向となっていた。

TRPV2 KO マウスの肺胞マクロファージの食食能については、優位差は得られなかったものの低下傾向が見られた。また、TRPV2 KO マウスにも喫煙をさせたところ、同じ期間の喫煙でも肺胞径の拡大はwild typeよりも大きい傾向にあり、TRPV2の欠損によって、COPDの形成が早まっていることが示唆された。

【結語】

喫煙によって肺胞マクロファージのTRPV2発現、および食食能が低下していることが確認された。また、TRPV2を抑制することでも食食能の低下が見られていたことから、TRPV2の発現低下は単独で食食能の低下を引き起こしていることが示された。喫煙による影響は様々であるが、その中の一つとしてTRPV2の発現低下が食食能の低下の原因となり、COPDの形成に要因の一つとなっていることが示唆された。また、TRPV2の欠損が喫煙に対する感受性を増加させている可能性が考えられた。